

**PATENT**

**IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE**

In re application of: **Tadashi MATSUNAGA et al.**

Serial Number: **Not Yet Assigned**

Filed: **August 26, 2003**

**Customer No.: 23850**

For: **METHOD OF EXTRACTING NUCLEIC ACID OR PROTEIN USING  
DENDORIMERS AND DENDORIMER-COMPOSITIONAL SUBSTANCES**

**CLAIM FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. 119**

Commissioner for Patents  
P. O. Box 1450  
Alexandria, VA 22313-1450

August 26, 2003

Sir:

The benefit of the filing date of the following prior foreign application is hereby requested for the above-identified application, and the priority provided in 35 U.S.C. 119 is hereby claimed:

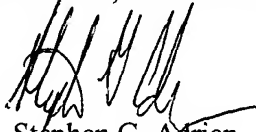
**Japanese Appln. No. 2002-269867, filed on September 17, 2002**

In support of this claim, the requisite certified copy of said original foreign application is filed herewith.

It is requested that the file of this application be marked to indicate that the applicants have complied with the requirements of 35 U.S.C. 119 and that the Patent and Trademark Office kindly acknowledge receipt of said certified copy.

In the event that any fees are due in connection with this paper, please charge our Deposit Account No. 01-2340.

Respectfully submitted,  
ARMSTRONG, WESTERMAN & HATTORI, LLP

  
Stephen G. Adrian  
Reg. No. 32,878

Atty. Docket No.: 030980  
Suite 1000, 1725 K Street, N.W.  
Washington, D.C. 20006  
Tel: (202) 659-2930  
Fax: (202) 887-0357  
SGA/yap

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2002年 9月17日

出 願 番 号

Application Number:

特願2002-269867

[ ST.10/C ]:

[ JP 2002-269867 ]

出 願 人

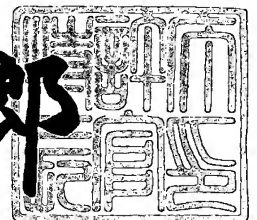
Applicant(s):

横河電機株式会社  
松永 是

2003年 6月 2日

特 許 庁 長 官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

太田 信一郎



出証番号 出証特2003-3042697

【書類名】 特許願  
 【整理番号】 02A0137  
 【あて先】 特許庁長官殿  
 【国際特許分類】 C12Q 1/68

【発明者】

【住所又は居所】 東京都小金井市本町4丁目20番15号

【氏名】 松永 是

【発明者】

【住所又は居所】 東京都小金井市中町2丁目24番16号 東京農工大学  
 工学部 生命工学科内

【氏名】 竹山 春子

【発明者】

【住所又は居所】 東京都小金井市中町2丁目24番16号 東京農工大学  
 工学部 生命工学科内

【氏名】 ブランドン ヨザ

【発明者】

【住所又は居所】 東京都武蔵野市中町2丁目9番32号 横河電機株式会  
 社内

【氏名】 福島 和久

【発明者】

【住所又は居所】 東京都武蔵野市中町2丁目9番32号 横河電機株式会  
 社内

【氏名】 佐藤 紗綾

【特許出願人】

【代表出願人】

【識別番号】 000006507

【氏名又は名称】 横河電機株式会社

【代表者】 内田 勲

【特許出願人】

【住所又は居所】 東京都小金井市本町4丁目20番15号

【氏名又は名称】 松永 是

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 005326

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 デンドリマーによる核酸またはタンパク質の抽出方法およびデンドリマー組成物

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

微粒子の表面に多層のデンドリマーを生成し、このデンドリマーの表面にアミノ基を生成して、このアミノ基により核酸またはタンパク質を抽出もしくは回収する、デンドリマーによる核酸またはタンパク質の抽出方法。

【請求項 2】

前記微粒子は、バクテリア由来の磁性体または人工磁性体または金属またはプラスチックビーズまたはガラスビーズまたはゲル状物質の微粒子であることを特徴とする請求項 1 記載のデンドリマーによる核酸またはタンパク質の抽出方法。

【請求項 3】

前記デンドリマーは、前記微粒子の表面にシリル化剤やシランカップリング剤を用いてシラン処理を施した上に積層されたことを特徴とする請求項 1 または 2 記載のデンドリマーによる核酸またはタンパク質の抽出方法。

【請求項 4】

前記デンドリマーは第 2 世代以上であることを特徴とする請求項 1 ないし 3 のいずれかに記載のデンドリマーによる核酸またはタンパク質の抽出方法。

【請求項 5】

前記デンドリマー表面に抗体を結合し、抗原抗体反応によりタンパク質を抽出することを特徴とする請求項 1 ないし 4 のいずれかに記載のデンドリマーによる核酸またはタンパク質の抽出方法。

【請求項 6】

微粒子と、この微粒子の表面に繰返し合成される多層のデンドリマーと、このデンドリマー表面を被覆するアミノ基から成り、このアミノ基により核酸またはタンパク質を捕捉することができるように構成されたことを特徴とするデンドリマー組成物。

【請求項 7】

前記微粒子は、バクテリア由来の磁性体または人工磁性体または金属またはプラスチックビーズまたはガラスビーズまたはゲル状物質の微粒子であることを特徴とする請求項 6 記載のデンドリマー組成物。

【請求項 8】

前記デンドリマーは、前記微粒子の表面にシリル化剤やシランカップリング剤を用いてシラン処理を施した上に積層されたことを特徴とする請求項 6 または 7 記載のデンドリマー組成物。

【請求項 9】

前記デンドリマーは第 2 世代以上であることを特徴とする請求項 6 ないし 8 のいずれかに記載のデンドリマー組成物。

【請求項 10】

前記デンドリマー表面に抗体を結合し、抗原抗体反応によりタンパク質を捕捉するように構成されたことを特徴とする請求項 6 ないし 10 のいずれかに記載のデンドリマー組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、核酸またはタンパク質を抽出する方法に関し、詳しくは、微粒子を用いたデンドリマーによって核酸またはタンパク質を抽出する方法および組成物に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

近年、DNA抽出の自動化は医療および実験現場で強く求められている。市販されている核酸またはタンパク質の抽出用の前処理装置としては、磁気ビーズ方式（磁気ビーズは、例えば非特許文献 1 参照。なお、磁気ビーズに限らず、磁性粒子、磁性体もある。磁性粒子については、例えば特許文献 1 参照。磁性体については、例えば特許文献 2 参照。）のものと遠心分離方式のものに大別される。

【0003】

【非特許文献 1】

松永是監修、「DNAチップ応用技術」、株式会社シーエムシー、2000年7月発行、第7章 磁気ビーズ利用DNAチップ 竹山春子, 松永是

【特許文献1】

特開平8-176212号公報

【特許文献2】

特開平11-313670号公報

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

上記磁気ビーズ方式は、遠心分離方式に比べて小型であり利便性がある。しかし、磁気ビーズの表面に形成した、核酸またはタンパク質を絡めとるための突起構造物が疎であるため、核酸またはタンパク質を絡めとる割合が少なく収率においては必ずしも満足のいく結果が得られないという問題があった。

【0005】

本発明の目的は、上記の課題を解決するもので、微粒子を内包したデンドリマーを構築し、核酸またはタンパク質を捕獲するためのアミノ末端基で被覆して、核酸またはタンパク質の回収率を大幅に増やすことのできる、デンドリマーによる核酸またはタンパク質の抽出方法およびデンドリマー組成物を実現することにある。

【0006】

【課題を解決するための手段】

このような目的を達成するために、請求項1の発明では、  
微粒子の表面に多層のデンドリマーを生成し、このデンドリマーの表面にアミノ基を生成して、このアミノ基により核酸またはタンパク質を抽出もしくは回収することを特徴とする。

微粒子の表面に複数世代のデンドリマーを生育させ、その表面にアミノ基を生成すると、核酸またはタンパク質を効率よく絡め取る能力がある。本発明はこの能力を巧みに用いた核酸またはタンパク質の抽出方法である。

【0007】

この場合、微粒子としては、請求項2のように、バクテリア由来の磁性体、人

工磁性体、金属、プラスチックビーズ、ガラスビーズ、ゲル状物質などの微粒子を用いることができる。また、前記デンドリマーは、請求項 3 のように微粒子の表面にシリル化剤やシランカップリング剤を用いてシラン処理を施した上に積層される。

また、デンドリマーは、請求項 4 のように 2 層以上であるのが望ましい。

【0 0 0 8】

また、請求項 5 のように、デンドリマー表面に抗体を結合し、抗原抗体反応によりタンパク質を抽出することもできる。

【0 0 0 9】

請求項 6 の発明は、微粒子と、この微粒子の表面に繰返し合成される多層のデンドリマーと、このデンドリマー表面を被覆するアミノ基から成り、このアミノ基により核酸またはタンパク質を捕捉することができるように構成されたことを特徴とする。

【0 0 1 0】

この場合、微粒子としては、請求項 7 のように、バクテリア由来の磁性体、人工磁性体、金属、プラスチックビーズ、ガラスビーズ、ゲル状物質などの微粒子を用いることができる。また、前記デンドリマーは、請求項 8 のように微粒子の表面にアミノシラン処理を施した上に積層する。また、デンドリマーは、請求項 9 のように 2 層以上であるのが望ましい。

また、請求項 1 0 のように、デンドリマー表面に抗体を結合し、抗原抗体反応によりタンパク質を抽出することもできる。

【0 0 1 1】

【発明の実施の形態】

本発明は、微粒子の表面にポリアミドアミンデンドリマーによる多重分岐修飾を合成させることにより、液体試料中から効率よく核酸またはタンパク質（以下 DNA を例にとる）を抽出する方法およびデンドリマー組成物である。

なお、本発明における微粒子としては、バクテリア由来の磁性体、人工磁性体、金属、プラスチックビーズ、ガラスビーズ、ゲル状物質などの微粒子が使用可能である。ただし、本実施例においては説明を簡潔にするためその一例であるバ



クテリア由来の磁性体を例に採って説明する。

【 0 0 1 2 】

固相磁性体は細胞質の夾雑物からDNAを抽出する際に非常に有効な手段である。従来方法に比べ、磁性体による抽出方法は時間が短縮でき、試薬使用量も少なく、また分離する際に自動化し易い。磁性体としてバクテリア由来の磁性体を用いた場合、その磁性体は大きさが50-60nmの酸化鉄で構成され単磁区構造を有しており、DNA抽出に適した大きさである。

【 0 0 1 3 】

以下図面を用いて本発明の一実施例を詳しく説明する。本発明では、微粒子、例えば生物由来の磁性体、の表面にシリル化剤やシランカップリング剤を用いてシラン処理を施し、その上にアクリル酸メチルとエチレンジアミンの反応により生成するアミドアミンをデンドロユニットとして積層させることにより多重分岐ポリアミドアミンデンドリマーを得る。

図1はこのような方法により作成されるデンドリマーの概念的構成図である。

【 0 0 1 4 】

(1) 図1に示す磁性体1として、例えばバクテリア由来の磁性体がいられる。バクテリア由来の磁性体は、バクテリアの細胞に圧力を加えて破壊した後、磁石を用いて回収し、これに適宜の処理を施すことにより得ることができる。

【 0 0 1 5 】

さらに詳述すれば次の通りである。集めたバクテリアの細胞を $1100 \text{ kg/cm}^2$ の圧力で5段階のステップを経て破壊する。破壊した細胞に均一磁場（表面磁場は0.37T）を与えた後、Nd-B磁石（10mm×10mm×6mm）により磁性体を取り出す。集めた磁性体は、超音波洗浄による滅菌処理を3回行い、その後バッファ液中に4°Cで保存する。

【 0 0 1 6 】

磁性体濃度は乾燥時の重量により決定する。磁性体は超音波により拡散させ、事前に180°Cで4時間乾燥させ重量を計測しておいた5mLのチューブに0.5mLずつ分注する。各分注磁性体は、超音波槽内で、クロロホルムとメタノールおよびヘキサンの1:1:1濃度溶液にて複数回洗浄する。

磁性体は磁気により溶液から分離し、溶剤を取り除く。収集した磁性体は、15分間の真空乾燥により残存溶媒を取り除いた後、180°Cで4時間乾燥させる。

## 【0017】

(2) 以上のようにして得られたバクテリア由来の磁性体の表面にシラン修飾を施す。磁性体溶液は全体で100mg/mLの濃度になるよう分注し、その後Nd-B磁石により磁性体を回収し、溶液を取り除く。磁性体は磁気により分離し、溶媒を取り除く。収集されたバクテリア由来の磁性体は真空中で15分間乾燥させ、残存溶媒を取り除いた後、元の溶液量と同量の99%エタノールの中に浮遊させておく。

## 【0018】

アミノシラン重合(AEEAという)は、99%エタノール中で1mM酢酸1%溶液により加水分解させたのち、生体由来の磁性体表面に直接共有結合させている。そして、磁性体を超音波槽内で軽く拡散させたのち、20mLのメタノールで3回洗浄し、元の分量で再浮遊させておいた。

## 【0019】

(3) 次に、以上のようにアミノシラン処理を施した磁性体表面に、多重分岐ポリアミドアミンデンドリマーを積層させる。

デンドリマー合成は、AEEA被覆された50mgのバクテリア由来の磁性体から始める(なお、比較のために、20mLのメチルアクリレート中の50mgの人工磁性体からも始めた)。

## 【0020】

懸濁状態を分散させるため、密閉されたロータリーエバポレーターを用いてナスフラスコを超音波水槽内で25°C、3時間浸ける。

磁性体を磁気により収集し、メタノールで洗浄する。洗浄後、4mLのメタノールとエチレンジアミンの1:1で反応させ、生成アミドアミンをデンドロユニットとして重合させる。以後同じ状態を保ちながら進める。

## 【0021】

メチルアクリレートとエチレンジアミンの繰返し反応により重合を進行し、目的とする世代まで行う(図1は2層までを示す)。

その後磁性体は25mLのメタノールにて3回洗浄し、次に25mLの水で洗浄する。

なお、洗浄から洗浄の間は磁気により収集する。

【0022】

(4) 次に、表面アミンを決定する。

修飾された磁性体 1 (250  $\mu$ g) を超音波槽内で200  $\mu$ L 10mM、スルホスクシンイミジル6-[3' (2-ピリジルジチオ)-プロピオンアミド]ヘキサノエート (sulfo-LC-SPDP) 溶液中に30分間浸し、成長伸長させる。処理された磁性体を蒸留水にて3回洗浄し、磁性体を磁気により収集する。

【0023】

磁性体と sulfo-LC-SPDP の重合体は200  $\mu$ L 20mM ジチオスレイトール (dithiothreitol) の中で成長反応した後、スペクトラム分光器の波長343nmにより、量的にも計測を行なう。データは修飾していない磁性体と性能比較し、濃度決定に関しては5mMの sulfo-LC-SPDP と20mM dithiothreitol によって得られる標準カーブに基づいて決定する。

【0024】

このようにして修飾された磁性体 (AEEA200  $\mu$ g を第3世代のデンドリマーと、AEEA100  $\mu$ g を第5、第6世代のデンドリマー) を、子牛の胸腺のDNA25  $\mu$ g と混合し、20mM のトリス塩酸緩衝液 (Tris-HCl) (pH7.0) 中で1mL となるようにし、上下に反転させた後、6000 rpm のマイクロ遠心を掛けてみると、次のような結果が得られた。

【0025】

上澄みの吸光度は260nm で観測され、DNA の濃度は calf thymus DNA の標準カーブから算定された。DNA は1mL 2M のNaCl 中で激しく攪拌することにより磁性体より剥離できた。DNA の存在はエタノール沈澱後アガロースゲル電気泳動により、確認することができた。

なお、本発明は、ルシフェラーゼ遺伝子が含まれる4.8kbp pGEM-Tプラスミドの抽出にも適用可能である。

【0026】

また、直接PCR分析のための大腸菌および全血からのDNA抽出も試みた。pGEM-Tプラスミドにルシフェラーゼ遺伝子を挿入した大腸菌を、50  $\mu$ g アンピシリンを

含む培養液中で細胞濃度 $10^6$ /mLに達するまで培養した。細胞は遠心分離により単離した。

## 【 0 0 2 7 】

細胞を、75  $\mu$ gのプロテナーゼKを含む10%Triton-X溶媒中に、50° Cで30分間浸けておくことにより溶解させる。溶解物に対し、第6世代まで成長させたバクテリア磁性体100  $\mu$ gを加え、手早くチューブを攪拌する。磁性体は磁気により集められ、上澄液は取り除かれる。

## 【 0 0 2 8 】

磁性体は20mMのTris-HCl(pH7.0)により6回洗浄し、毎回チューブを上下に振り浮遊物を磁気により集める。DNAは1mL2MのNaCl中で十分攪拌し、磁性体から剥離させる。磁性体はマイクロ遠心器にて6000 rpmで遠心分離する。

## 【 0 0 2 9 】

剥離したDNAは吸光分光光度計にて測定し、2M NaCl中でのDNA溶液の標準検定曲線と比較した。260 : 280という比率を分光光度計にて決定する。一方で同様の抽出を行ったロット分について、PCR増幅用として、磁性体からDNAの剥離は行わず、そのまま100  $\mu$ L 蒸留水 (Mill-Q) 水中に浮遊させた。そして、磁性体に超音波をかけながらMill-Q水にて希釈し、プラスミドをPCR増幅した。

## 【 0 0 3 0 】

順方向プライマーとしては、

5' GGGATGCATATGGAAGACGCCAAAAACATA3'

を用い、逆方向プライマーとしては、

5' GGGATGCATACTTGATTACAATTTGGACTTTCC3'

を使用し、プラスミド中で発見された1.65kbpのルシフェラーゼ遺伝子を増幅した。

## 【 0 0 3 1 】

PCR産物はゲル電気泳動にて可視化できる。ヒト全血1  $\mu$ Lから抽出したDNAについても、同様のPCRによる手順に従って分析した。サンプルは新規のものを使用し、凝固防止剤は使用しなかった。

## 【 0 0 3 2 】

全血のPCRに用いた順方向プライマーとしては、

5' GGCCTCCCACACCAG3'

を使用し、逆方向プライマーとしては、

5' GCGGGCCAGGCGTCAGCACCAGTA3'

を使用した。

#### 【 0 0 3 3 】

以上の点をまとめると、次の通りである。

バクテリア由来磁性体表面のアミン数は、デンドリマー層の数が1から6に増えるに連れて増えた。アミン数は、図1に示すように、理論的にはスタートラインのアミノシラン層から世代数が増えるに従い2倍ずつ増えることになる。

#### 【 0 0 3 4 】

表1は各世代でのバクテリア由来磁性体（BMP）のアミン数を表わす。表1に示すように、各層でアミンが倍化するということは、デンドリマーが理想的なカスケード構造を保っていることを意味している。バクテリア由来磁性体1個の表面積は、 $50 \times 50 \times 100 \text{ nm}$ の矩形と仮定すると、 $2.5 \times 10^4 \text{ nm}^2$ である。第6世代表面ではアミン数が $1.7 \times 10^6$ であったので、 $68 \text{ アミン} / \text{nm}^2$ という数字が得られた。

#### 【 0 0 3 5 】

表 1

世代	アミン数/BMP	増加率 (%)
AEEA	$2.1 \times 10^4$	
第1世代	$6.8 \times 10^4$	350
第3世代	$2.6 \times 10^5$	370
第5世代	$1.1 \times 10^6$	420
第6世代	$1.7 \times 10^6$	150

#### 【 0 0 3 6 】

図2はバクテリア由来磁性体の修飾していないものと、修飾したものとの電子顕微鏡写真である。図2（a）に示すように、修飾していない磁性体は相互の斥

力が弱く、凝集しているのが分かる。第3世代のデンドリマーは同図(b)に示すように鎖状に連なり、部分的に凝集している。第6世代のデンドリマーは、同図(c)のように明らかに分散している。そして図2(d)に示すように、磁性体表面を被覆している約4nmの層が観察された。

## 【 0 0 3 7 】

デンドリマーで修飾されたバクテリア由来磁性体は超音波を掛けた後でも極端な劣化は認められなかった。そして、非常によく分散していて、大きな凝集を作ることも無く、超音波を当てなくても十分良く分散浮遊した。

## 【 0 0 3 8 】

一方、人工磁性体では、表2に示すように、世代数の増大と共に、超音波を当てた際徐々に破碎され易くなることが確認できた。表2は、生成された磁性体のサイズと分布の表である。

第6世代まで人工磁性体をデンドリマー伸長させた場合、約14nmの多量の断片が溶液中に拡散されていた。さらに、サイズが小さくなったことと、構造が不完全になったことで凝集は大幅に減り、常磁性体の断片が生じた。

## 【 0 0 3 9 】

表 2

	分布数 (%) ( > 125 n m )	分布数 (%) ( 50-125 n m )	分布数 (%) ( < 50 n m )
バクテリア磁性体 被膜なし	6	9 4	0
バクテリア磁性体 第 6 世代	1	9 9	0
人工磁性体 修飾なし	1 8	8 2	0
人工磁性体 第 1 世代	0	3 4	6 6
人工磁性体 第 3 世代	0	1 7	8 2
人工磁性体 第 6 世代	0	0	1 0 0

## 【 0 0 4 0 】

バクテリア由来の磁性体に連続的にデンドリマーを生育させていくと、表 3 に示すように DNA を効率よく絡めとる能力があることが分かった。この場合、修飾した磁性体を 25  $\mu$  g の calf thymus DNA に混ぜた。デンドリマーを第 6 世代まで伸長させた磁性体には過剰濃度の DNA ( 50  $\mu$  g ) に混ぜた。

## 【 0 0 4 1 】

表 3

世代	100 $\mu$ g 磁性体当たりの DNA ( $\mu$ g )
AEEA	3.59 $\pm$ 0.37
第 1 世代	4.43 $\pm$ 0.26
第 3 世代	5.89 $\pm$ 0.07
第 5 世代	11.95 $\pm$ 0.68
第 6 世代	24.83 $\pm$ 1.61

## 【0042】

デンドリマー修飾した磁性体では、デンドリマー層が増えるに従い、DNAを絡めとる量が増え、第6世代では100  $\mu$ gの磁性体当たり24.83 $\pm$ 1.61  $\mu$ gのDNAを絡めとることができた。

## 【0043】

なお、人工磁性体では、第0世代であるAEEA層の回収量とデンドリマー伸長層とでDNAを絡めとる量は変わらない。これは超音波により、磁性体にひび、破砕等の劣化が生じたためと考えられる。

## 【0044】

第6世代までデンドリマー修飾したバクテリア由来の磁性体において、2MのNaClを加えただけではDNA回収は十分ではなく、24%しか回収できなかった（表4参照）。回収率を上げるために、DNA重合体を50℃で30分間恒温槽内で保持したことにより、回収率は87%にまで上昇した（21.7 $\pm$ 1.59  $\mu$ g）。

## 【0045】

表4

DNA	条件	DNA ( $\mu$ g) /100 $\mu$ g	回収率
Calf thymus	30° C, 10min	6.07 $\pm$ 1.01	24%
Plasmid	50° C, 30min	21.70 $\pm$ 1.59	87%
Plasmid digests	50° C, 30min	19.22 $\pm$ 1.61	81%

## 【0046】

小さなDNA断片の捕捉能力についても検討した。ルシフェラーゼ遺伝子を含むプラスミドpGEM-Tを抽出し、大体3kbpと1.6kbpの2種類の産物を作成した。プラスミドDNAの捕捉・回収量は各々23.80 $\pm$ 3.01および19.22 $\pm$ 1.61  $\mu$ gであった。この結果をゲル電気泳動で調べた結果、サイズの違いによる差異は認められなかった。図3（a）に示すように、回収されたDNAは事前に磁気回収されたDNAと一致した。



## 【 0 0 4 7 】

大腸菌から抽出したDNA量の測定は、2M NaClを用いて磁性体から剥離回収した後に行った。回収したDNAは、RNA分解酵素（RNase）で処理した後測定した結果、第6世代デンドリマー修飾磁性体100  $\mu$ g当たり30.25 $\pm$ 7.74  $\mu$ g回収できた。

260 : 280 nmの比は1.92であり、多少の蛋白質が混入を起こしていることを示している。前述のゲル電気泳動の結果も、多少のRNA汚染を起こしていることを示している。

## 【 0 0 4 8 】

この結果、次に細胞溶解後、3  $\mu$ LのRNaseを加え、37° C、20分インキュベーションした後測定すると、DNAの回収率は22.35 $\pm$ 1.76  $\mu$ gまで減少した。PCRは、磁性体およびDNAの複合体を事前に塩もしくはRNaseでの溶解処理を行わず、サンプルを100-1000倍の希釈率で、直接行った〔図3（b）参照〕。

同様に、ヒト全血から抽出したDNAについても同じプロセスで、10-100倍の希釈率で、直接PCRを行うことができた。

## 【 0 0 4 9 】

このような結果に基づき次のように結言できる。

アミノシランがデンドリマー成長の重合開始剤としてバクテリア由来の磁性体に共有結合することによりデンドリマー修飾が層状に伸長できること、および磁性細菌AMB-1から得られたバクテリア由来磁性体にアミノシランの共役結合を用い安定的な架橋が形成できるということは周知である。

## 【 0 0 5 0 】

バクテリア由来の磁性体上にデンドリマーがうまく形成されていることは、表面上のアミン基の数を調べればよい。表面上のアミン基の数は第6世代まで各世代毎に直線的に倍増することが認められた。しかし、第6世代以降は正確にアミン基の数は数えられなかった。

## 【 0 0 5 1 】

何故ならば、大きな環状のsulfo-LC-SPDPヘキサマーが立体障害となるためと見られる。そして以前より、世代が増えれば、それだけインキュベーションのための時間を多くとる必要があることが分かっていた。

## 【 0 0 5 2 】

これは、分子が成長する際の立体障害を避けるために、時間を掛けて成長する必要があると考えられていた。第5世代から第6世代へ伸長させる際、試薬を投入しそれ以上アミン基が増えないことを確認できるまでには、インキュベーション時間を6時間まで延長する必要があった。

## 【 0 0 5 3 】

したがって、第6世代を超えてさらに世代を重ねることは可能ではあるが、物理的には容易に決められない。さらに、TEM画像から類推すると、世代が増えるとイオン間の斥力が増す。第1世代だけであればバクテリア由来の磁性体は硬く凝集する。第3世代までであると、バクテリア由来の磁性体はチェーンのように列を作る。この現象は、図4に示すように磁力の強弱は磁極方向の磁束密度に比例することからも示唆される。

## 【 0 0 5 4 】

イオン斥力の存在は磁性体の局配列を減殺する方向となる。これは、バクテリア由来の磁性体が生体膜で覆われているケースでも同じである。すなわち、第6世代のデンドリマーの斥力は非常に大きく、磁力を上回ることになり、凝集せず実際に個々が浮遊することになる。

## 【 0 0 5 5 】

人工的に磁性体を合成することは可能であるが、形が揃わず、結晶化も十分でなく、構造上も均一でないので、物性としての動特性や化学動態が一定でない。もし、人工磁性体を用いて、バクテリア由来の磁性体と同じ大きさのデンドリマーを作成した場合、人工磁性体重合物には凝集や破砕が起き、表面上のアミン基の増加はリニアとはならなくなる。

生体由来の磁性体は結晶化しているので、デンドリマー生成過程においても欠損することなく、オリジナルの形状及び磁気を保持している。

## 【 0 0 5 6 】

デンドリマー修飾した生体由来の磁性体は、修飾していない磁性体に比べDNAの回収率が大幅に増える。DNAは磁性体の表面を覆う強固なシランカチオンの規則正しい構造の中に凝縮され、デンドリマーとの相互作用により同じような形体

をとる。デンドリマー修飾した生体由来の磁性体により増加した陽イオンは負に帯電されているDNAを絡めとる力を増加するのに大いに役立っている。陽イオン試薬を追加するとDNAの濃度が上がることから分かる。

#### 【 0 0 5 7 】

しかし、陽イオン試薬を追加することは不要なコンタミネーションを惹起することにもなりかねない。デンドリマー修飾した生体由来磁性体を用いれば、陽イオン試薬を追加することなくDNA回収率を上げることができる。さらに、周知のように、表面上のアミノ基の数を調節することにより、溶液中の分散度や複合濃度を制御することができる。

#### 【 0 0 5 8 】

本発明のように磁性体を使うことは、従来法に比べ処理時間の面、試薬使用量の面、分離回収の面そして自動化の容易さにおいて優っている。プロセスは洗浄工程の前に溶解工程が求められるだけで、極めてシンプルである。さらに、PCRを少ないサンプル量から行わなければならないという制限がある場合、少量のサンプルから十分なDNAを抽出するのに最適な方法であり、この方法は小型化にも応用できる。

#### 【 0 0 5 9 】

なお、本発明は、上記実施例に限定されることなく、その本質から逸脱しない範囲で更に多くの変更、変形をも含むものである。

#### 【 0 0 6 0 】

例えば、デンドリマー表面に抗体を結合し、抗原抗体反応によりタンパク質を抽出することも可能である。

#### 【 0 0 6 1 】

##### 【発明の効果】

以上説明したように本発明によれば次のような効果がある。

(1) 生体由来の微粒子の表面にデンドリマーを多重分岐し、アミノ末端基で被覆することにより、容易に核酸あるいはタンパク質の抽出率を増やすことができる。

(2) 微粒子を包含するデンドリマーを用いることは、処理時間の面、試薬使用

量の面、分離回収の面そして自動化の容易さにおいて従来の磁気ビーズ法より優る。

【 0 0 6 2 】

(3) 微粒子表面にデンドリマー修飾をするときは凝集しないように強力な超音波をかけて十分拡散させておく必要があるが、微粒子として生体由来の磁性体を用いた場合は超音波によりクラッキングを起こすこともなく容易に十分なデンドリマーを形成することができる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

本発明におけるデンドリマーの概念的構成図である。

【図 2】

バクテリア由来磁性体の電子顕微鏡写真である。

【図 3】

DNAの電気泳動結果を示す図である。

【図 4】

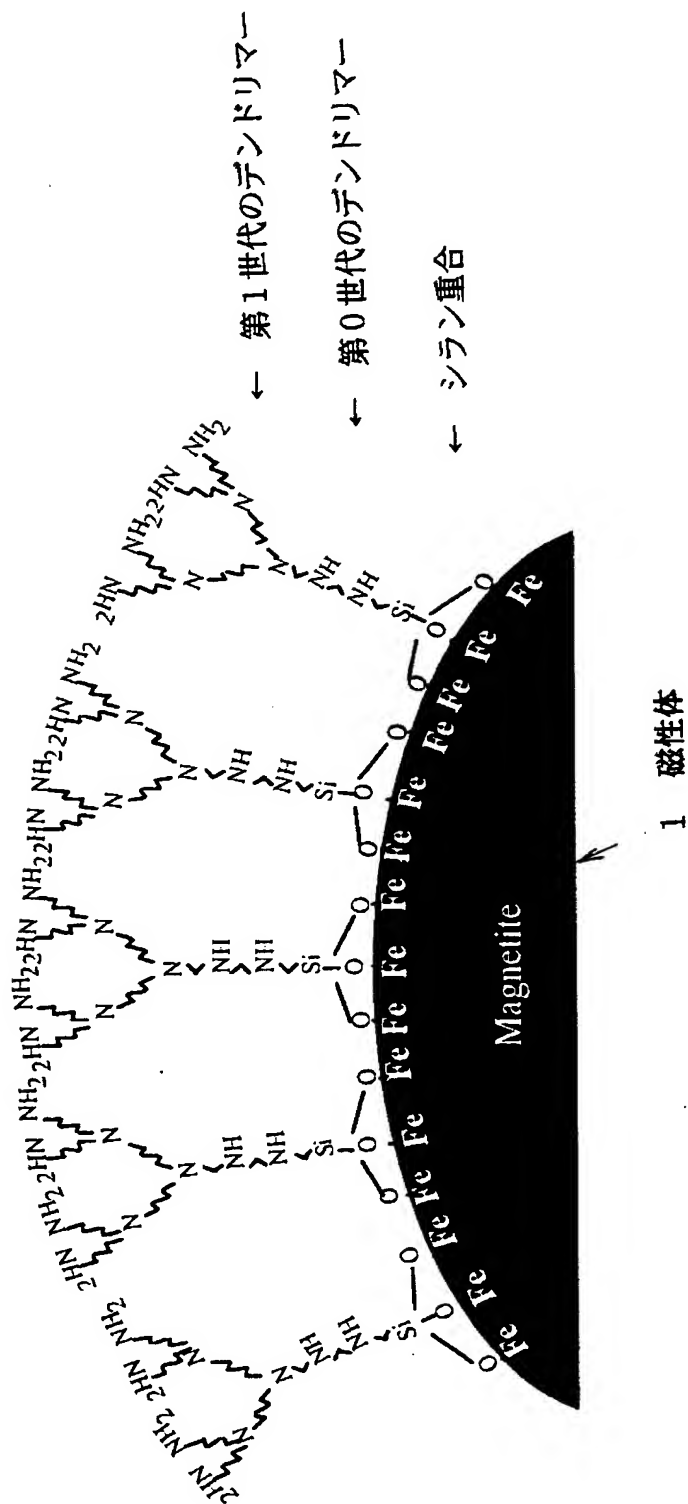
バクテリア磁性体の磁界を説明する図である。

【符号の説明】

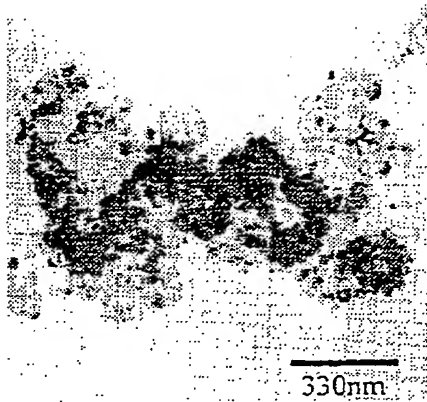
1 磁性体

【書類名】 図面

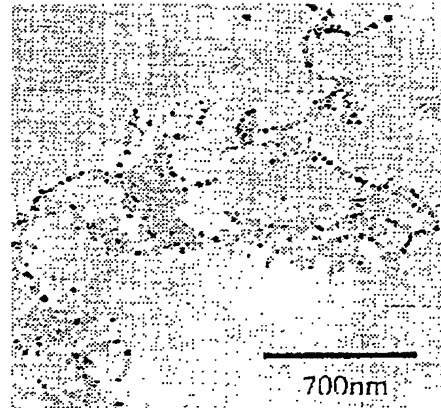
【図 1】



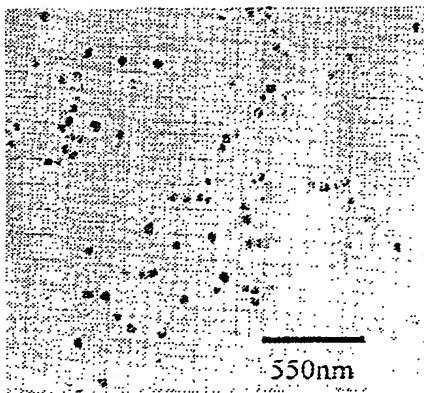
【図 2】



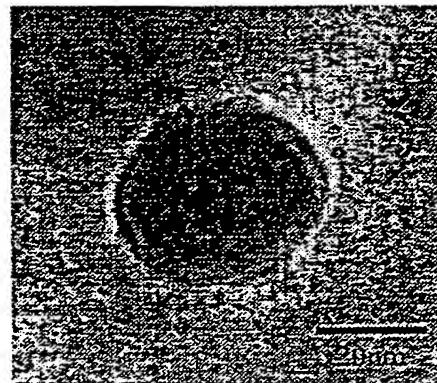
(a)



(b)

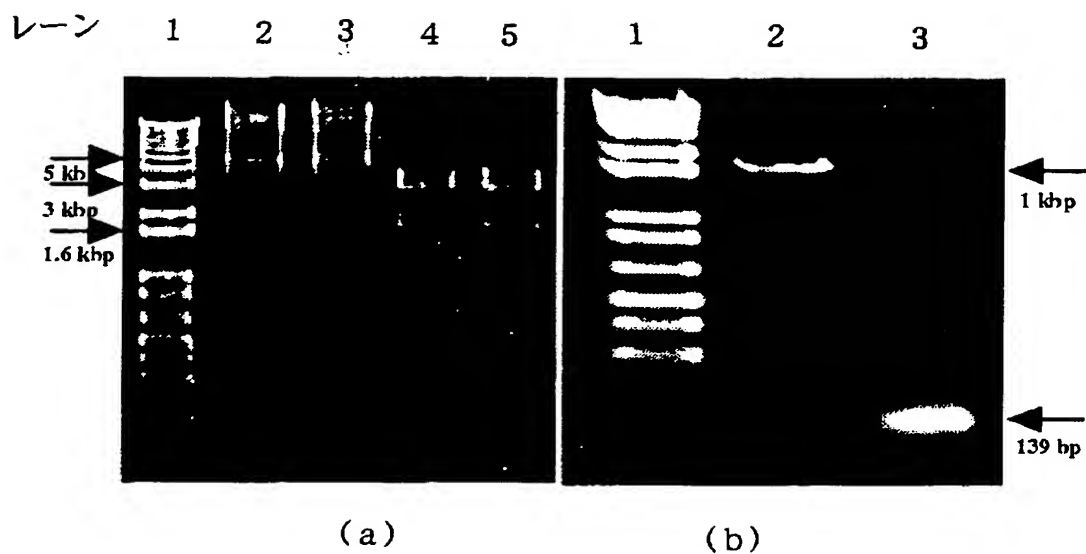


(c)

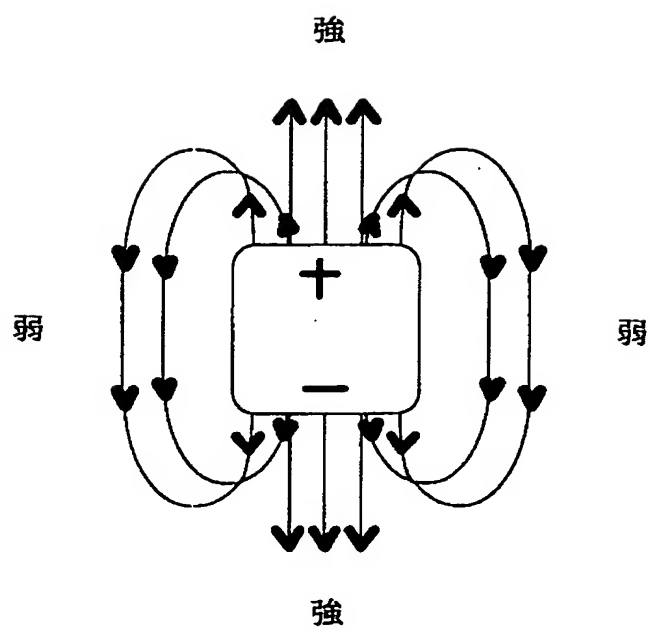


(d)

【図 3】



【図 4】



【書類名】                      要約書

【要約】

【課題】 微粒子を内包したデンドリマーを構築し、核酸またはタンパク質を捕獲するためのアミノ末端基で被覆して、核酸またはタンパク質の回収率を大幅に増やすことのできる、デンドリマーによる核酸またはタンパク質の抽出方法およびデンドリマー組成物を実現する。

【解決手段】 微粒子の表面に多層のデンドリマーを生成し、このデンドリマーの表面にアミノ基を生成して、このアミノ基により核酸またはタンパク質を抽出もしくは回収する。

【選択図】                      図 1



認 定 ・ 付 加 情 報

特許出願の番号	特願 2 0 0 2 - 2 6 9 8 6 7
受付番号	5 0 2 0 1 3 8 5 5 6 2
書類名	特許願
担当官	宇留間 久雄 7 2 7 7
作成日	平成 1 4 年 1 1 月 2 6 日

< 認定情報・付加情報 >

【提出日】	平成14年 9月17日
【特許出願人】	申請人
【識別番号】	000006507
【住所又は居所】	東京都武蔵野市中町2丁目9番32号
【氏名又は名称】	横河電機株式会社
【特許出願人】	
【識別番号】	591033744
【住所又は居所】	東京都小金井市本町4-20-15
【氏名又は名称】	松永 是

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [ 0 0 0 0 0 6 5 0 7 ]

1. 変更年月日 1 9 9 0 年 8 月 1 0 日  
[変更理由] 新規登録  
住 所 東京都武蔵野市中町 2 丁目 9 番 3 2 号  
氏 名 横河電機株式会社

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [ 5 9 1 0 3 3 7 4 4 ]

1. 変更年月日 1 9 9 9 年 3 月 3 日  
[変更理由] 住所変更  
住 所 東京都小金井市本町 4 - 2 0 - 1 5  
氏 名 松永 是